

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202121094

· 论著 ·

鼻咽癌肿瘤相关成纤维细胞的实验分析

杨明¹, 范小琴², 鄢敏¹, 韩灵¹, 郑朝攀¹

(1. 深圳市人民医院暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 广东深圳 518020;
2. 深圳市纳米酶肿瘤转化医学重点实验室 深圳市转化医学研究院 深圳市第二人民医院/深圳大学第一附属医院耳鼻咽喉科, 广东深圳 518035)

摘要: **目的** 分离、培养和鉴定鼻咽癌肿瘤相关成纤维细胞(CAFs)及正常成纤维细胞(NFs), 并鉴定探讨两种成纤维细胞的生物学差异。**方法** 临床收集新鲜鼻咽癌组织和鼻咽炎组织经胶原酶和胰酶消化后, 利用 Matrigel 胶混合 3D 成球培养获得成纤维细胞。通过显微镜观察细胞形态, 利用细胞免疫荧光染色、Western blot 和 CCK8 检测 CAFs 标准物。**结果** 分离得到的 NFs 及 CAFs 形态和生物学形状存在差异, 两者都高表达波形蛋白(Vimentin), CAFs 高表达血管平滑肌肌动蛋白(α -SMA), 且增殖能力增强。**结论** 利用 Matrigel 混合 3D 成球培养的方法能成功分离、培养成纤维细胞; 与 NFs 相比, CAFs 高表达 α -SMA, 且增殖能力增强。

关键词: 鼻咽癌; 肿瘤相关成纤维细胞; 分离; 培养; 鉴定

中图分类号: R739.63

Isolation, cultivation and identification of cancer associated fibroblasts in nasopharyngeal carcinoma

YANG Ming¹, FAN Xiaoqin², YAN Min¹, HAN Ling¹, ZHENG Chaopan¹

(1. Department of Otolaryngology, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, the First Affiliated Hospital, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518020, China; 2. Shenzhen Key Laboratory of Nanozymes and Translational Cancer Research, Department of Otolaryngology, and Institute of Translational Medicine, Shenzhen Second People's Hospital/the First Affiliated Hospital of Shenzhen University Health Science Center, Shenzhen 518035, China)

Abstract: **Objective** To investigate the isolation, cultivation and identification of the cancer associated fibroblasts (CAFs) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) and normal fibroblasts (NFs), To explore the biological difference between the two kinds of fibroblasts. **Methods** Fresh tissues from NPC patients and nasopharyngitis ones were collected and digested by collagenase and tyrisin, and then the cells were mixed with Matrigel. After culturing with the Matrigel 3D pellet-forming method for a week, the CAFs were obtained. The CAFs associated biomarkers were tested by the immunofluorescence staining, Western blot and CCK8. **Results** The cell morphology and biological shape of the isolated NFs and CAFs were different. Both of them were highly expressed by Vimentin, while CAFs were also highly expressed by α -smooth muscle actin with enhanced proliferation ability. **Conclusions** The Matrigel 3D pellet-forming culture method can be performed successfully to isolate and culture fibroblasts. Compared with NFs, CAFs has a high expression of α -SMA and enhanced proliferation ability.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; Cancer associated fibroblast; Isolation; Cultivation; Identification

肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 在恶性肿瘤发生发展中具有重要的调控作用, 肿瘤相

关成纤维细胞 (cancer associated fibroblasts, CAFs) 作为 TME 中数量最丰富的一类细胞, 是 TME 的重

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81902777)。

第一作者简介: 杨明, 女, 医学硕士, 主治医师。

通信作者: 郑朝攀, Email: zhengclimb@hotmail.com

要组成成分,并通过与肿瘤细胞相互作用,促进肿瘤发生发展和转移,成为近年靶向 TME 治疗的研究热点^[1-3]。在 TME 中 CAFs 通过分泌多种细胞因子 (cytokine)、趋化因子 (chemokine) 和炎症因子 (inflammatory cytokines) 等激活肿瘤细胞内多条信号通路,从而促进肿瘤细胞的生长、侵袭、转移和血管生成^[4-5]。然而,大量研究显示在 TME 中不同肿瘤类型或不同肿瘤来源的 CAFs 细胞存在高度的异质性,导致 CAFs 的类型和生物学作用存在很大差异^[6]。因此分离、培养和鉴定不同类型 TME 中的 CAFs 成为目前 TME 研究的前沿问题^[7]。目前,针对 TME 中 CAFs 的研究较少^[8]。本研究通过鼻咽癌和鼻咽炎新鲜组织 3D 培养的新方法,分离、培养和鉴定 CAFs,为研究 CAFs 在鼻咽癌发生发展和转移中生物学作用等基础研究提供了前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂耗材 I 型胶原酶 (Sigma 公司 #SCR103), 胰蛋白酶 (Sigma 公司 #T1426), PBS (Hyclone 公司 #SH30256), 胎牛血清 (Sigma 公司 #F8687), DMEM (Gibco 公司 #C11995065), RPMI-1640 (Gibco 公司 #C11875500BT), CAFs 标志物检测试剂盒 (CST 公司 #31549), ECL 化学发光试剂盒 (Protein technology 公司 #PK10002), Matrigel (Corning 公司 #356234), 青链霉素 (Hyclone 公司 #SV30010), BCA 蛋白定量试剂盒 (Protein technology 公司 #23225), RIPA 细胞裂解液 (碧云天公司 #P0013B), DMSO (Sigma 公司 #D8779), 蛋白酶抑制剂 (Roche 公司 #4693116001), 磷酸酶抑制剂 (Roche 公司 #4906837001)。

1.1.2 组织样本 收集深圳市人民医院 2020 年 1—6 月临床病理鉴定的新鲜鼻咽癌组织和鼻咽炎组织各 3 例。新鲜组织经鼻内镜取下后立即置于含有 50% RPMI-1640, 40% FBS, 10% DMSO 组织保存液中, 30 min 内送到实验室。所有纳入研究的临床患者均告知并同意签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 成纤维细胞的分离和培养 新鲜组织用含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青链霉素的 PBS 洗 2 次, 然后用眼科剪子剪碎。加 5 mL I 型胶原酶混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1h, 300 rpm, 离心 5 min, 弃上清。加入 2 mL, 0.25% 的胰酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min, 加等体积

20% FBS 的 DMEM 培养基终止, 300 rpm, 离心 5 min, 弃上清。再加入 2 mL 20% FBS 的 DMEM 培养基重悬, 过 100 目分子筛, 收集过滤液体 1 200 rpm, 离心 5 min, 弃上清。

消化后的单细胞悬液用 20 μL DMEM 培养基重悬后, 加入 300 μL 的 Matrigel 混匀, 取 30 μL 混合液在 6 孔板中种 3D 球培养, 加完后立即倒扣置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 10 min。在加入 2.5 mL 含 10% FBS DMEM 完全培养基培养, 间隔 2 d 换 1 次液。

1.2.2 成纤维细胞传代 正常培养 1 周后, 在 3D Matrigel 球周围长出呈长梭状的细胞的成纤维细胞 (normal fibroblasts, NFs), 取出培养皿, 用枪轻轻将 Matrigel 的球吹落弃掉, 培养皿里贴壁生长的细胞为我们需要的成纤维细胞。用胰酶消化重新铺板, 培养, 稳定传代 5 代后, 收集细胞用于后续鉴定。

1.2.3 免疫荧光实验检测 CAFs 的标准物的表达

将稳定传代 5 代的 CAFs, 将细胞正常消化后, 铺于细胞爬片上, 48 h 后收集细胞, 用 4% PFA 室温固定半小时, PBS 洗 2 次, 0.2% Triton X-100 的 PBS 透化 10 min, 含 10% 山羊血清的 PBS 封闭 1 h, 2% 山羊血清的 PBS 配制的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗两次, 相应荧光二抗室温避光孵育 1 h, PBS 洗 2 次, DIPA 室温避光孵育 10 min, PBS 洗 2 次, 封片、成像、拍照。

1.2.4 Western blot 实验检测 CAFs 标准物的表达

将稳定传代 5 代的 CAFs 总蛋白用 RIPA (加入 1X 蛋白酶抑制剂和 1X 磷酸酶抑制剂) 裂解液裂解提取。总蛋白浓度用 BCA 蛋白定量法提取。总蛋白 10 μg 用 10% 的 SDS-PAGE 跑胶分离后, 转膜、封闭、一抗 [波形蛋白 (Vimentin), 血管平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和甘油醛磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydro genase, GAPDH) 的稀释浓度按 1:1 000) 孵育过夜、二抗 (山羊抗兔, 山羊抗鼠的稀释浓度按 1:2 000)、ECL 显影。

1.2.5 细胞增殖 CCK8 实验 收集成功传代 5 代的成纤维细胞, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL, 按每孔 2 000 个接种于 96 孔板中, 每组做 3 个副孔, 分别在 24、48、72 h, 弃培养基, 加入含 10 μL CCK8 试剂的无血清 DMEM 培养基 100 μL , 培养箱孵育 3 h 后, 上酶标仪检测 OD450 nm 的吸收值。

1.3 统计学处理

应用 Prism 7.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌 CAFs 胞形态学观察

本研究通过3D培养的方法培养1周后,发现在3D球周围长出呈长梭形、条束状,胞质丰富,胞核位于胞体中央。用枪轻轻吸取培养基吹掉3D球后,再用PBS清洗后,加培养基继续培养置长满6孔板,用胰酶正常消化传代。

正常传代5次后,结果如图1所示NFs生长速度较慢,扁平状,边缘规则,细胞排列按一定方向无重叠生长。而与NFs相比,CAFs生长速度较快,长梭形,胞浆丰富,边缘不规则形成毛刺状突起,细胞间排列不规则。

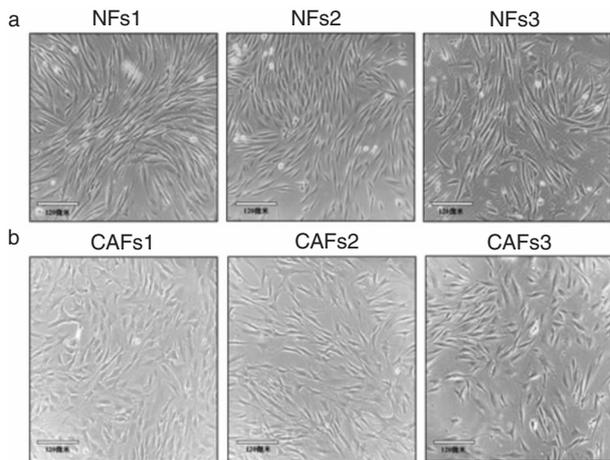


图1 原代分离成纤维细胞形态 (SP × 40) a: NFs; b: CAFs

2.2 鼻咽癌 CAFs 标准物免疫荧光鉴定

为了鉴定分离的成纤维细胞纯度,将细胞爬片进行免疫荧光染色,图2所示NFs和CAFs细胞Vimentin染色都呈强阳性,证实这两种细胞高表达间质标志物Vimentin。而与NFs相比,a-SMA作为CAFs的特异性标志物在CAFs中表达呈强阳性,这一结果证实鼻咽癌肿瘤中CAFs高表达a-SMA。

2.3 鼻咽癌 CAFs 高表达 a-SMA

随后,我们将稳定传代5代后的细胞通过Western blot实验检测CAF标准物Vimentin,a-SMA在CAFs中的表达情况。实验结果如图3所示,与NFs相比,Vimentin的表达水平基本一致,但a-SMA在CAFs中的表达显著升高,进一步证实鼻咽癌CAF高表达a-SMA。

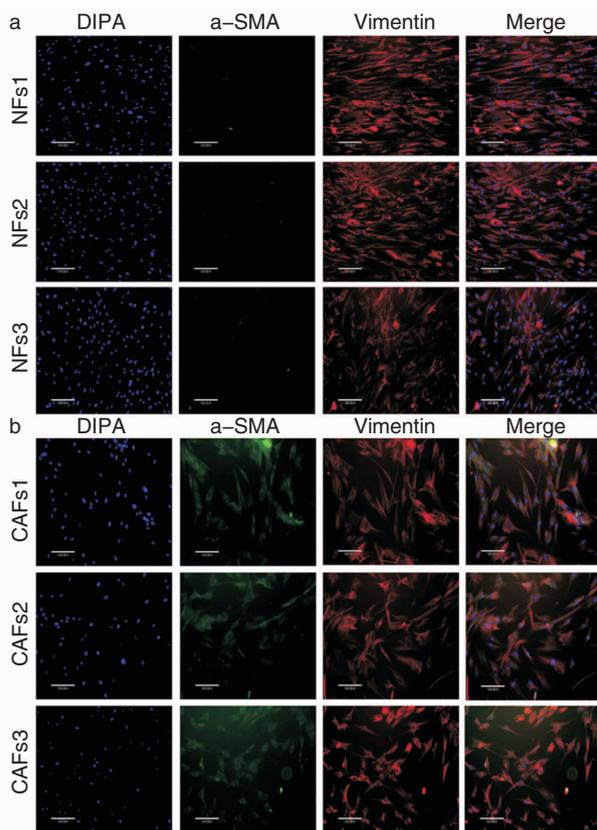


图2 原代分离成纤维细胞免疫荧光染色 (免疫荧光 × 40) a: NFs; b: CAFs

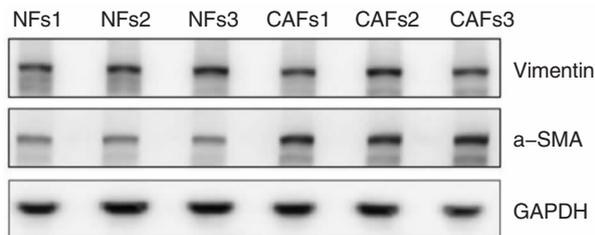


图3 Western blot 检测鼻咽炎组织中NFs与鼻咽癌组织中的CAFs表达情况

2.4 鼻咽癌 CAFs 增殖能力

我们将稳定传代5代后的细胞,消化后铺板,每组重复3个复孔,分别在24、48、72h后加入CCK8试剂孵育3h后用酶标仪检测检测在450nm波长处侧吸收值(OD值),每组检测结果如表1所示。

根据检测结果绘制生长曲线如图4所示,与NFs相比,CAFs的增殖速度明显加快,增殖能力明显增加。

表 1 CCK8 实验检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	NFs1	NFs2	NFs3	CAFs1	CAFs2	CAFs3
24	0.214 ± 0.004	0.232 ± 0.011	0.184 ± 0.010	0.365 ± 0.002	0.273 ± 0.015	0.276 ± 0.015
48	1.135 ± 0.018	0.931 ± 0.010	1.030 ± 0.045	1.429 ± 0.045	1.291 ± 0.004	1.334 ± 0.026
72	1.625 ± 0.023	1.454 ± 0.053	1.510 ± 0.088	2.06 ± 0.017	1.944 ± 0.033	2.034 ± 0.057

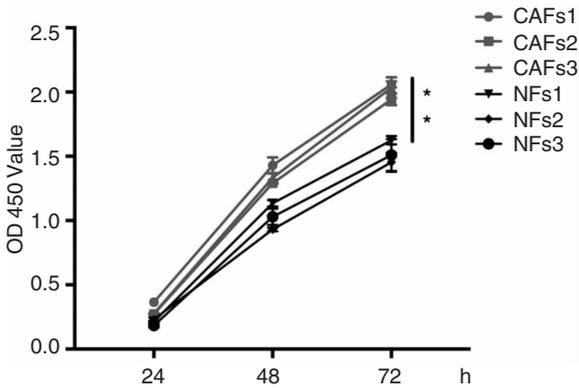


图 4 NFs 与 CAFs 的增殖能力曲线图

3 讨论

研究显示在 TEM 中 CAFs 促进肿瘤生长、转移的观点已经被广大研究者认同^[9]。由于不同肿瘤来源的 CAFs 存在高度异质性,其在 TEM 中的作用和分子机制仍然存在着很多未知的领域,尤其 CAFs 在肿瘤免疫治疗方面,近年研究证实 CAFs 是抗肿瘤免疫反应的重要调节因子,因此原代分离、纯化和鉴定不同肿瘤特异的 CAFs 可为后续研究提供材料依据^[10-11]。近年研究报道中尚无鼻咽癌 CAFs 原代培养、鉴定的报道,本研究参照国内外报道的 CAFs 原代酶消化分离方法并结合 3D 培养,成功分离培养并鉴定了高纯度的鼻咽癌 CAFs。

近年,研究报道的原代分离 CAFs 的方法主要是组织块贴壁法和酶消化法。其中组织块贴壁法虽然简单易行,但也存在如周期长、纯度差和效率低等缺点。酶消化法则周期短,重复性好等优点,但由于肿瘤组织经酶消化后是多种细胞的混合体,所以在培养纯度上存在很大问题^[12]。本研究将组织经酶消化后,结合 Matrigel 混合通过 3D 球培养,利用成纤维细胞贴壁生长的特性,在培养过程中简单快速将成纤维细胞与其他细胞分离,且能保证细胞活性。

原代细胞体外培养,最重要的就是保持细胞的生物学特性,我们通过此法可以得到高纯度的成纤维细胞,且经过多次传代后再通过形态学观察、细胞免疫荧光染色, Q-PCR 和 Western blot 技术等对成纤维细胞的特异蛋白标志物进行检测,对分离的成

纤维细胞进行了定性研究。结果发现,鼻咽癌 CAFs 与 NFs 相比,在细胞形态,蛋白标志物和生物学特性等方面存在差异。本研究发现鼻咽癌 CAFs 细胞较大,梭形,胞浆丰富,边缘不规则形成毛刺状突起,细胞间排列不规则;特异蛋白标志物 Vimentin, α -SMA 的表达呈阳性,据此我们对鼻咽癌 CAFs 进行了鉴定。以上结果与胃癌、肝癌等肿瘤体外分离培养的 CAFs 与 NFs 的表型特性相似,证实我们的方法和鉴定结果是可靠可行的^[13-14]。

最后,我们对成纤维细胞生物学功能进行了初步鉴定,CCK8 检测实验结果发现相对于 NFs、CAFs 的增殖能力更强,这也证实在鼻咽癌肿瘤微环境中间质细胞 CAFs 处于激活状态,从而可能在鼻咽癌的发生、发展和转移中发挥了重要作用。

综上所述,本研究成功分离、纯化并鉴定了鼻咽癌 CAFs,有望进一步结合临床治疗研究、CAFs 基因遗传命运图谱和单细胞测序等先进生物技术手段,阐明 CAFs 在鼻咽癌发病机制中的生物学作用和抗肿瘤免疫治疗方面提供了新的材料研究基础。

参考文献:

- [1] Affo S, Yu LX, Schwabe RF. The role of cancer-associated fibroblasts and fibrosis in liver cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 153 - 186.
- [2] Sazeides C, Le A. Metabolic relationship between cancer-associated fibroblasts and cancer cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1063:149 - 165.
- [3] Höpken UE, Rehm A. Targeting the tumor microenvironment of leukemia and lymphoma[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(6):351 - 364.
- [4] Shemesh A, Kundu K, Peleg R, et al. Nkp44-Derived peptide binds proliferating cell nuclear antigen and mediates tumor cell death[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1114.
- [5] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3):1997 - 2007.
- [6] Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2):99 - 115.
- [7] Costa A, Kieffer Y, Scholer-Dahirel A, et al. Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer

- [J]. *Cancer Cell*,2018,33(3):463-479. e10.
- [8] Huang SCM, Tsao SW, Tsang CM. Interplay of viral infection, host cell factors and tumor microenvironment in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancers (Basel)*,2018,10(4):106.
- [9] Komohara Y, Takeya M. CAFs and TAMs; maestros of the tumour microenvironment[J]. *J Pathol*,2017,241(3):313-315.
- [10] Liu T, Han C, Wang S, et al. Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy[J]. *J Hematol Oncol*,2019,12(1):86.
- [11] Denton AE, Roberts EW, Fearon DT. Stromal Cells in the tumor microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*,2018,1060:99-114.
- [12] Peng H, Xue R, Ju Z, et al. Cancer-associated fibroblasts enhance the chemoresistance of CD73(+) hepatocellular carcinoma cancer cells via HGF-Met-ERK1/2 pathway[J]. *Ann Transl Med*,2020,8(14):856.
- [13] Jia C, Wang G, Wang T, et al. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition via the transglutaminase 2-

dependent IL-6/IL6R/STAT3 axis in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Biol Sci*,2020,16(14):2542-2558.

- [14] Bae CA, Ham IH, Oh HJ, et al. Inhibiting the GAS6/AXL axis suppresses tumor progression by blocking the interaction between cancer-associated fibroblasts and cancer cells in gastric carcinoma [J]. *Gastric Cancer*,2020,23(5):824-836.

(收稿日期:2021-03-24;网络首发:2021-09-08)

本文引用格式:杨明,范小琴,鄢敏,等. 鼻咽癌肿瘤相关成纤维细胞的实验分析[J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*,2021,27(5):577-581. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202121094

Cite this article as: YANG Ming, FAN Xiaoqin, YAN Min, et al. Isolation, cultivation and identification of cancer associated fibroblasts in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2021,27(5):577-581. DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202121094

· 消息 ·

远程投稿、查稿系统启事

本刊采用远程稿件采编系统进行投稿、查稿等,现就有关问题说明如下。

1. 作者投稿:登陆在线投稿系统(中文版),按操作提示投稿。第一次需先注册,原则上不再受理邮寄稿件和 Email 稿件。
2. 稿件查询:使用作者注册用户名和密码,可查询作者稿件审理进程和费用信息等。
3. 有关投稿要求,请登陆本刊网站浏览。本刊唯一指定官方网站为:<http://www.xyosbs.com>